

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET  
BIOLOŠKI ODSJEK

**Utjecaj solnog stresa na vrstu *Opuntia streptacantha*  
Lem.**

**Effects of salt stress on *Opuntia streptacantha* Lem.  
species**

Sandi Paulišić

Preddiplomski studij molekularne biologije

Undergraduate study of molecular biology

Mentor: doc. dr. sc. Biljana Balen

Zagreb, 2010

## Sadržaj

1. Uvod .....	2
2. Materijali i metode .....	3
2.1 Biljni materijali i uvjeti rasta .....	3
2.2 Tretman solnim stresom i apscizinskom kiselinom (ABA) .....	3
2.3 Mjerenje debljine kladodija i duljine korijena .....	3
2.4 Sadržaj prolina i klorofila .....	4
2.5 Izolacija RNA, sinteza cDNA, kloniranje i sekvenciranje .....	4
2.6 „ <i>P5CS activity assay</i> “ .....	5
3. Rezultati i rasprava .....	5
3.1 Utjecaj solnog stresa na debljinu kladodija i duljinu korijena .....	5
3.2 Utjecaj solnog stresa na sadržaj prolina .....	6
3.3 Utjecaj solnog stresa na ekspresiju gena $\Delta^1$ -pirolin-5-karboksilat-sintetaze kod vrste <i>O. streptacantha</i> Lem. (gen <i>Osp5cs</i> ) .....	8
3.4 Utjecaj apscizinske kiseline (ABA) na ekspresiju gena <i>Osp5cs</i> .....	10
3.5 Utjecaj solnog stresa na aktivnost $\Delta^1$ -pirolin-5-karboksilat-sintetaze .....	11
3.6 Utjecaj solnog stresa na sadržaj klorofila kladodija .....	11
4. Zaključak .....	12
5. Popis literature .....	13
6. Sažetak .....	15
7. Summary .....	16

## 1. Uvod

U sušnim se područjima slana voda često koristi u poljoprivredi zbog nedostatka slatke vode. Tijekom posljednjih 45 godina mnogo se pažnje posvetilo utjecaju natrijeva klorida (NaCl) na rast biljaka i njihovu proizvodnju. Osnovne mehanizme koji determiniraju odgovor biljaka na salinitet još uvijek ne razumijemo u potpunosti (Amzallag et al. 1990.).

Tijekom posljednjeg desetljeća *Opuntia spp.* Mill. je postala vrlo važna u polupustinjskim područjima Meksika gdje ima stratešku ulogu u poljoprivredi za osobe potrebe (eng. *subsistence agriculture*) (Pimienta 1994). Ove su vrste važne zbog svoje sposobnosti prilagodbe na različite klimatske uvjete te su kultivirane u pustinja i polupustinjskim područjima mnogih država (Pimienta 1994).

Opuncija (*Opuntia spp.* Mill.) je jestiva kao voće i povrće, a sadi se kao ukrasna biljka i kao poljoprivredna kultura. Također se koristi za stabilizaciju poljoprivrednog tla, kao živica u vrtovima te za smanjenje utjecaja vjetera na eroziju tla. Proizvodi dobiveni od opuncije uključuju ulje dobiveno iz sjemenki i parfem iz cvjetova. Tradicionalno je povrće u Meksiku „*nopalito*“ (kladodij) koji se koristi u mnogim vrstama hrane. „*Nopalito*“ je mladi izdanak vrsta *Opuntia ficus-indica* (L.) Mill., *O. streptacantha* Lem., *Opuntia amyclaea* Tenore (syn. *O. ficus-indica* f. *amyclea* (Ten.) Schelle i *O. ficus-indica* var. *amyclea* (Ten.) Berger) te drugih sličnih vrsti.

Smatra se da je salinitet glavni faktor ograničavanja biljnog razvitka i produktivnosti, prvenstveno važnih usjeva. Solni stres uzrokuje inhibiciju biljnog rasta zbog smanjenja dostupnosti vode, nakupljanja natrijevih iona i mineralne neravnoteže što vodi staničnom i molekularnom oštećenju (Silva-Ortega 2007).

Prolin (Pro) je jedan od osmolita u biljkama koji se najviše nakuplja u uvjetima nedostatka vode i solnog stresa (Delauney 1993, Jimenez-Bremont 2006, Tripathi 2007). Pro djeluje kao osmoprotektor, proteinski stabilizator te stabilizator staničnih membrana interagirajući s fosfolipidima, djeluje na hidroksilne radikale i služi kao izvor ugljika i dušika (Kavi Kishor, 2005). U biljkama se biosinteza Pro zbiva dvama putevima iz glutamata (Glu) ili iz ornitina, međutim čini se kako je biosinteza Pro iz Glu predominantna posebno tijekom stresnih uvjeta (Delauney 1993).  $\Delta^1$ -pirolin-5-karboksilat-sintetaza (P5CS:  $\gamma$ -glutamil kinaza i glutamat-5-semialdehid dehidrogenaza) katalizira prva dva koraka biosinteze Pro iz Glu kod biljaka (Hu 1992). Kod *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. i riže (*Oryza sativa* L.) dokazana je povezanost između indukcije gena  $\Delta^1$ -pirolin-5-karboksilat-sintetaze (gen *p5cs*) i akumulacije Pro (Yoshida 1995, Igarashi 1997).

Vrste roda *Opuntia* Mill. su općenito osjetljive na salinitet ali iznimno tolerantne na sušu. Malo se zna o nakupljanju osmolita tijekom abiotičkog stresa kod *Opuntia* Mill., a nije poznato ni postoji li povezanost između akumulacije Pro tijekom abiotičkog stresa i indukcije transkripcije gena *p5cs*.

## 2. Materijali i metode

### 2.1 Biljni materijali i uvjeti rasta

Sjemenke skupljene s vrste *O. streptacantha* Lem. iz polupustinjskog područja Meksika, oprane su i stavljene na sušenje 24 sata, a zatim su pohranjene na 25 °C tijekom 6 mjeseci kako bi se prekinula dormancija nakon čega su prenesene u komoru za klijanje pri 25 °C i 12 h svjetla. Mlade su biljke tijekom jednog tjedna bile u Hoaglandovoj otopini kako bi se prilagodile prije početka samog eksperimenta.

### 2.2 Tretman solnim stresom i apscizinskom kiselinom (ABA)

Biljke *O. streptacantha* Lem. stare 9 tjedana s kladodijem prosječne duljine  $9.0 \pm 0.5$  cm, prenesene su u podlogu pijeska/perlita u semihidroponskim uvjetima. Hoaglandova hranjiva otopina različitih koncentracija NaCl-a (0, 75, 150, 250 i 350 mM) primjenjivana je na biljke tijekom 6, 9 i 11 dana, gdje se nakon svakog tretmana izolirala ukupna RNA i procjenio sadržaj Pro i klorofila.

Biljke *O. streptacantha* Lem. stare 12 tjedana s kladodijem prosječne duljine  $10,5 \pm 0,5$  cm prenesene su u podlogu pijeska/perlita u istim uvjetima kao mlade biljke. Tretirane su različitim koncentracijama apscizinske kiseline (0, 0,1 i 100  $\mu$ M) primjenom Hoaglandove hranjive otopine u uvjetima svjetla tijekom 1,5 h te su nakon tretmana zaleđene u tekućem dušiku za izolaciju ukupne RNA.

### 2.3 Mjerenje debljine kladodija i duljine korijena

Svaka je mlada biljka kaktusa mjerena početnog, šestog, devetog i jedanaestog dana tretmana. Mjereni su duljina i debljina kladodija te duljina korijena tretiranih i kontrolnih biljaka. Kalibarski šestar je korišten za utvrđivanje potencijalnih morfoloških razlika tretiranih biljaka. Postotak duljine i debljine kladodija te duljine korijena tretiranih biljaka izračunat je s obzirom na kontrolne biljke.

## 2.4 Sadržaj prolina i klorofila

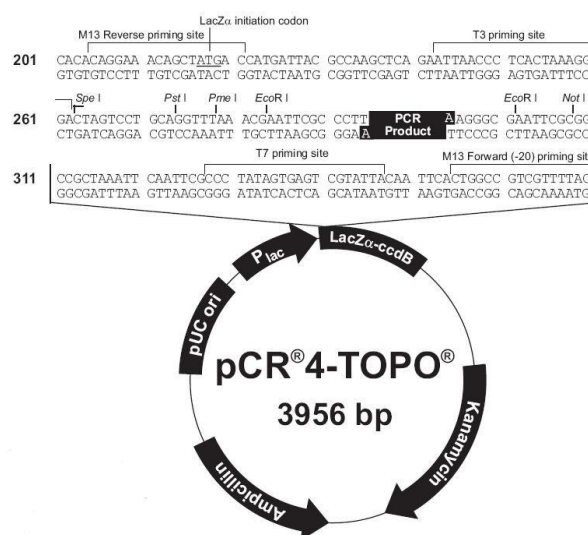
Prolin je ekstrahirano kuhanjem 0,5 g biljnog materijala u 2 mL destilirane vode nakon čega je dodan natrijev citrat i ninhidrin te je smjesa kuhana 1 sat. Za ekstrakciju je dodano 2 mL toluena i zatim je smjesa centrifugirana 25 min na 12000 g, a sadržaj Pro je izmjeren spektrofotometrijski pri 520 nm. Pigment klorofila je ekstrahirano u 80 %-tnom acetonu i mjerena je apsorbanacija spektrofotometrijski pri 645 i 663 nm.

## 2.5 Izolacija RNA, sinteza cDNA, kloniranje i sekvenciranje

Iz kladodija *O. streptacantha* Lem. ekstrahirana je ukupna RNA pomoću „kita“, dok je prvo-lančana (eng. *first-strand*) cDNA sintetizirana lančanom reakcijom polimeraze uz reverznu transkriptazu (engl. *reverse transcriptase-polymerase chain reaction*, RT-PCR) nakon čega su RNA kalupi iz hibrida cDNA:RNA odstranjeni Rnazom H *E. coli*.

Za umnažanje pojedinih fragmenata otvorenog okvira čitanja (eng. *open reading frame*, ORF) RT-PCR-om, stvoreni su različiti setovi početnica. Početnice gena *p5cs* stvorene su na temelju konzerviranih regija enzima P5CS iz raznih biljaka. Uzorci dobiveni RT-PCR-om analizirani su elektroforezom na 0,8 %-tnom agaroznom gelu. Produkti RT-PCR-a očekivane veličine klonirani su u vektor pCR4-TOPO (Slika 1.) i sekvencirani DNA automatskim sekvencerom nakon čega su slijedile usporedbe i poravnanja proteinskih sekvenci.

Za umnažanje fragmenata gena *Osp5cs* RT-PCR-om, korištene su definirane početnice i jednaka količina RNA za svaku od tretiranih biljaka *O. streptacantha* Lem.. Elektroforezom su odvojeni RT-PCR produkti na 1 %-tnom agaroznom gelu te je provedena kvantifikacija signala, a svaki je signal normaliziran s obzirom na aktinski signal.



Slika 1. PCR produkti su uklonirani u vektor pCR4-TOPO (plazmid, TOPO TA Cloning Kit, Invitrogen, Carlsbad, USA) na zadano mjesto naznačeno na slici (PCR Product) i zatim sekvencirani (preuzeto s <http://www.xenbase.org/common/showImage.do?imageId=40966>)

## 2.6 „P5CS activity assay“

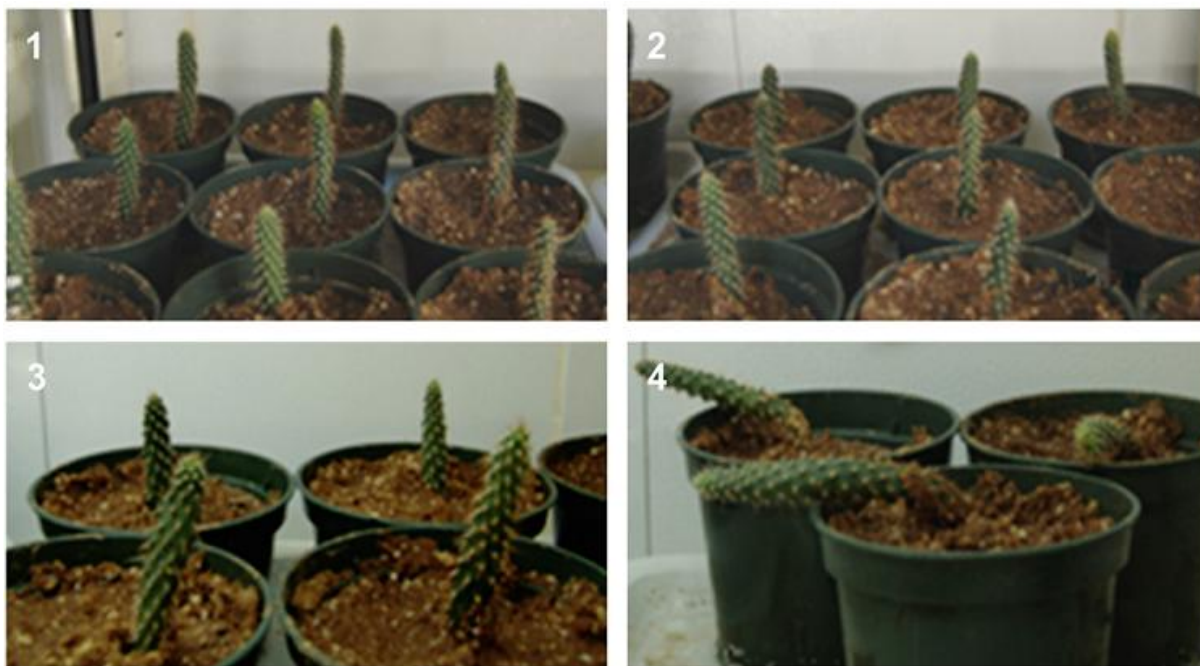
U puferu za ekstrakciju homogenizirani su kladodiji te je ekstrakt centrifugiran 20 min na 4°C i 10000 g, a supernatant je ponovno centrifugiran 20 min na 4°C i 10000 g. Aktivnost enzima P5CS je određena kao  $\gamma$ -glutamil kinaza u ekstraktu enzima prateći stvaranje  $\gamma$ -glutamil hidroksamata. Centrifugiranjem su odstranjeni precipitirani proteini te je izmjerena apsorbanacija pri 535 nm. Aktivnost je izražena kao U  $\mu\text{g}^{-1}$  što predstavlja količinu enzima potrebnog za stvaranje 1  $\mu\text{mol}$   $\gamma$ -glutamil hidroksamata  $\text{min}^{-1}$ .

## 3. Rezultati i rasprava

Na mladim biljkama *O. streptacantha* Lem. starim 9 tjedana, ispitano je utječe li solni stres na gen *p5cs* i na sadržaj prolina. Biljke su tretirane NaCl-om koncentracija 0 (kontrola), 75, 150, 250 i 350 mM tijekom 11 dana. Mjereni su različiti fiziološki parametri poput duljine i debljine kladodija te duljine korijena *O. streptacantha* Lem.. Ispitivan je utjecaj solnog stresa na sadržaj Pro i na sadržaj klorofila kladodija te na aktivnost i ekspresiju  $\Delta^1$ -pirolin-5-karboksilat-sintetaze ( $\gamma$ -glutamil kinaze i glutamat-5-semialdehid dehidrogenaze). Promatran je utjecaj abscizinske kiseline (ABA) na ekspresiju gena *Osp5cs*.

### 3.1 Utjecaj solnog stresa na debljinu kladodija i duljinu korijena

Smanjenje rasta karakteristika je biljaka osjetljivih na sol i očituje se kod vrsta roda *Opuntia* Mill. koje su mjesecima bile podvrgnute solnom stresu (Franco-Salazar 2007, Murillo-Amador 2001, Nerd 1991). Kod mladih biljaka *O. streptacantha* Lem. koje su podvrgnute solnom stresu nije došlo do vidljivih vanjskih oštećenja osim značajnog smanjenja sukulencije koja je rezultirala mlohavim kladodijima devetog dana stresa pri 350 mM NaCl te pri 250 i 350 mM NaCl jedanaestog dana stresa (Silva-Ortega 2007). Zbog kratkog perioda u kojem su biljke bile izložene solnom stresu nije došlo do značajnih promjena u rastu kladodija (Slika 2.), mjereno kao ukupna duljina samog kladodija. U usporedbi s kontrolnim biljkama primijećeno je smanjenje debljine kladodija mladih biljaka koje su bile tretirane višim koncentracijama NaCl-a (250 i 350 mM) za otprilike 25 % (Silva-Ortega 2007). Kod *O. ficus-indica* (L.) Mill. primijećeno je smanjivanje debljine kladodija s povećanjem saliniteta (Murillo-Amador 2001).



**Slika 2.** Biljke *O. streptacantha* Lem. nakon 0 (1), 6 (2), 9 (3) i 11 (4) dana tretmana s 350 mM NaCl (Silva-Ortega 2007)

Solni stres iznimno utječe na inhibiciju rasta korijena kod kaktusa i agava (Nobel 1994), što je dokazano primjerima na rodu *Opuntia* Mill., gdje je kod vrsta *O. humifusa* (L.) Mill. i *O. ficus-indica* (L.) Mill. salinitet značajno utjecao na duljinu korijena (Murillo-Amador 2001, Silverman 1988). Pod utjecajem solnog stresa došlo je do značajnog smanjenja duljine korijena, za 45 % devetog dana pri koncentracijama od 75 i 150 mM NaCl te već na početku šestog dana za 30 % pri 250 i 350 mM NaCl-a (Silva-Ortega 2007).

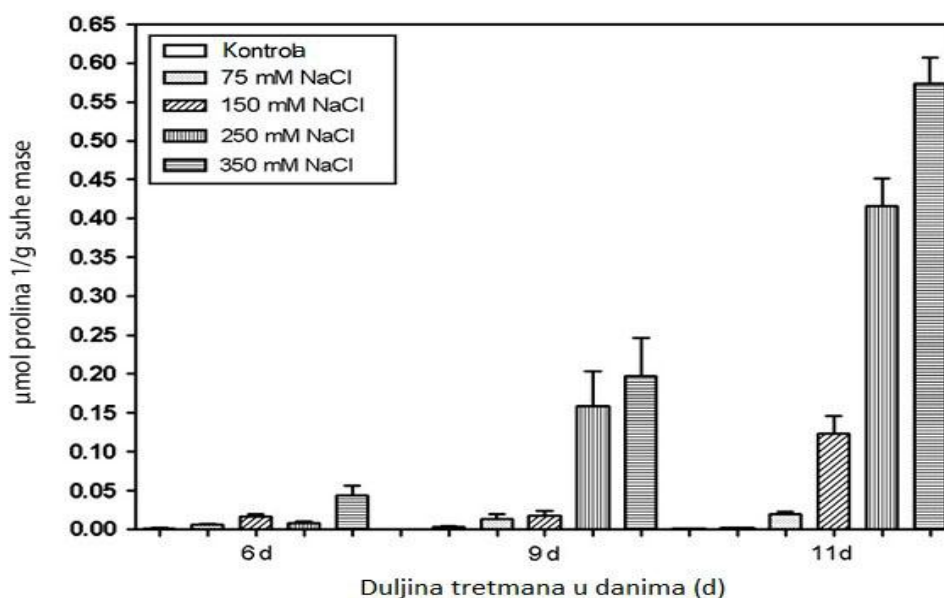
Smanjenjem debljine kladodija i duljine korijena biljke *O. streptacantha* Lem., ukazuju na pogođenost utjecajem solnog stresa. Primjećeno je smanjenje sukulencije kao posljedica uskraćene vode zbog saliniteta (Slika 2.), što možda ukazuje da su mlade biljke *O. streptacantha* Lem. pod osmotskim stresom, a samim time možda je došlo do nakupljanja osmolita kao što je Pro s obzirom da on sudjeluje u osmotskoj regulaciji i djeluje kao osmoprotektor.

### 3.2 Utjecaj solnog stresa na sadržaj prolina

Visoka razina saliniteta, mala dostupnost vode i niska temperatura kao i ostali okolišni čimbenici mogu potaknuti nakupljanje jedne ili više topljivih tvari poput Pro, glicinbetaina (*glycinebetaine*), poliola ili šećera u biljaka (Delauney 1993, Rhodes 1993). Obitelj kaktusa (*Cactaceae*) uključuje mnoge vrste koje zauzimaju ekstremna staništa i stvaraju mnoge tvari

koje vjerojatno mogu doprinijeti toleranciji na ove okolišne uvjete kao što su primjerice antocijanini zamijenjeni betalainima.

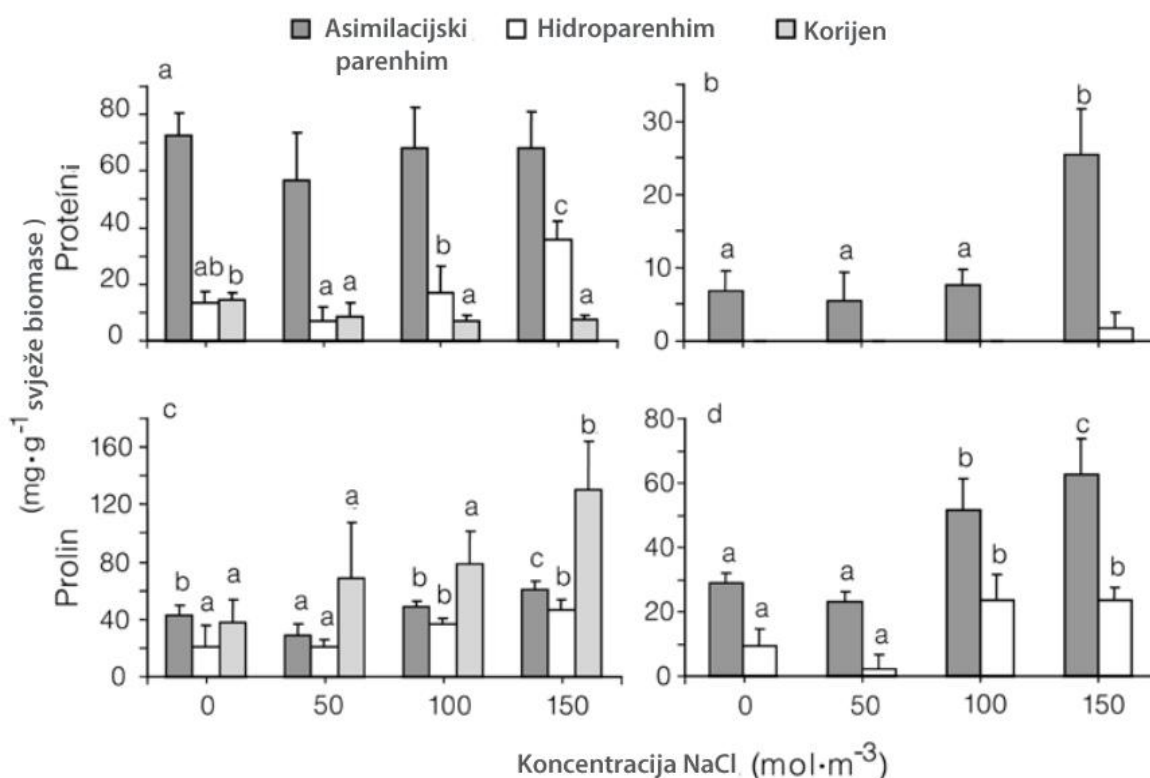
Kod vrsta roda *Opuntia* Mill., nakupljanje Pro u uvjetima suše i solnog stresa je rijetko proučavano. Općenito se nakupljanje Pro povećava s povišenjem koncentracije NaCl-a i duljinom tretmana. Šestog dana u uvjetima solnog stresa dolazi do značajnog peterostrukog povećanja sadržaja Pro kod mladih kladodija *O. streptacantha* Lem. pri izlaganju 350 mM NaCl-u (Slika 3.) u usporedbi s netretiranim kladodijima (Silva-Ortega 2007). Nakupljanje Pro je iznimno povećano devetog dana pri koncentracijama od 250 i 350 mM NaCl s 15- do 20-erostrukim povećanjem u usporedbi s kontrolom, dok je jedanaestog dana pri istim koncentracijama nakupljanje bilo 20- do 30-erostruko povećano (Silva-Ortega 2007).



**Slika 3.** Sadržaj Pro u kladodijima mladih *O. streptacantha* Lem. koje su izložene tretmanu s 0, 75, 150, 250 i 350 mM NaCl-om tijekom 6, 9 i 11 dana (prilagođeno prema Silva-Ortega 2007)

Sadržaj Pro kod vrste *O. ficus-indica* (L.) Mill., mjereno u bazalnim i apikalnim kladodijima i korijenju, pokazuje povećanje količine Pro kod najvećih koncentracija NaCl od 150 mM (Slika 4.) (Franco-Salazar 2007). Primjećeno je dvostruko povećanje sadržaja Pro u uvjetima temperaturnog stresa kod jednog od kultivara *O. megacantha* Salm-Dyck, pri 47 °C, u usporedbi s kontrolom (Flores-Hernandez 2001).





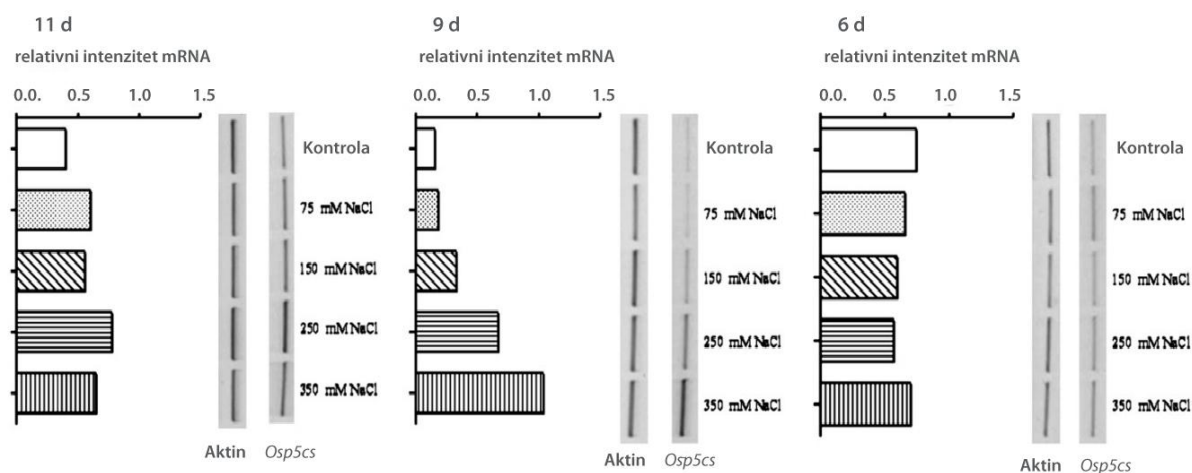
**Slika 4.** Sadržaj Pro i proteina u asimilacijskom parenhimu, hidroparenhimu (transfuzijski) i korijenu bazalnih (a i c) i apikalnih kladodija (b i d) te korijena (a i c) biljaka *O. ficus-indica* (L.) Mill. uzgajanih pri različitim koncentracijama NaCl-a (prilagođeno prema Franco-Salazar 2007)

Zbog svojih karakteristika formiranja hidrofilnih koloida u vodenom mediju i interagiranja s proteinom pomoću hidrofobne okosnice, Pro može očuvati strukturu i aktivnost proteina (enzima) s kojim je u interakciji. U uvjetima temperaturnog i solnog stresa, Pro smanjuje uzrokovanu denaturaciju proteina *in vitro*. Povećanje sadržaja Pro u uvjetima solnog stresa može kod roda *Opuntia* Mill. djelovati kao izvor topljivih tvari za unutarstanične osmotske prilagodbe u takvim uvjetima.

### 3.3 Utjecaj solnog stresa na ekspresiju gena $\Delta^1$ -pirolin-5-karboksilat-sintetaze kod vrste *O. streptacantha* Lem. (gen *Osp5cs*)

Sekvence gena za  $\Delta^1$ -pirolin-5-karboksilat-sintetazu (P5CS) kod biljaka imaju visoko konzervirane regije čijih se nekoliko mjesta može koristiti za dizajniranje konzensusnog slijeda (eng. *consensus sequence*) početnica za lančanu reakciju polimerazom (eng. *polymerase chain reaction-PCR*) kako bi klonirali željene gene u biljku od interesa.

Biljke *O. streptacantha* Lem. stare 9 tjedana podvrgnute su različitim koncentracijama NaCl-a (0, 75, 150, 250, 350 mM) kroz 6, 9 i 11 dana te je izolirana ukupna RNA iz mladih kladodija (Slika 5.) (Silva-Ortega 2007). Stupanj transkripcije gena *Osp5cs* istražen je RT-PCR-om koristeći uzorke RNA (1µg), kako bi odredili postoji li povezanost između nakupljanja Pro potaknutog solnim stresom i transkripcijske regulacije kod *Opuntia spp.* Mill. (Silva-Ortega 2007). Za provođenje analize RT-PCR-om, amplificiran je fragment aktinske cDNA od 630 pb koji odgovara ORF fragmentu aktina iz *Opuntia* Mill. te je korišten kao kontrola (Silva-Ortega 2007). RT-PCR produkti su odvojeni elektroforezom na 1 %-tnom agaroznom gelu (Silva-Ortega 2007). Nakon šest dana stresnih uvjeta ekspresija *Osp5cs* gena nije se promjenila, no do njezinog je postupnog povećanja došlo devetog dana uz povišenje koncentracije NaCl-a, dok je glavina nakupljenog transkripta opažena jedanaestog dana stresa



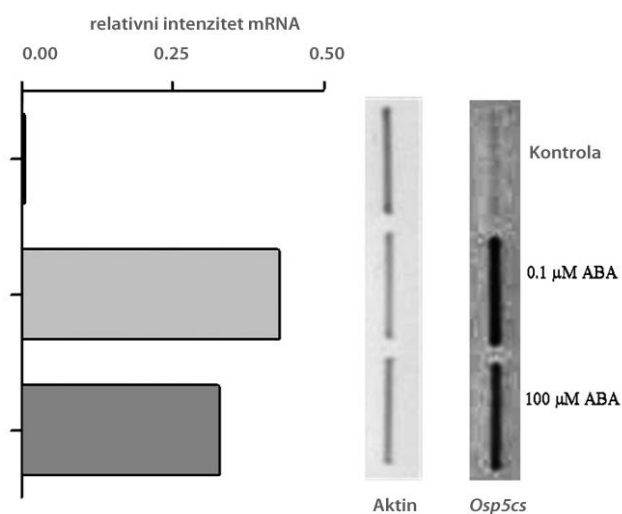
**Slika 5.** Utjecaj solnog stresa na ekspresiju gena *Osp5cs*. Devet tjedana stari kladodiji *O. streptacantha* Lem. korišteni su za izolaciju ukupne RNA uz prethodne tretmane NaCl-om (0, 75, 150, 250 i 350 mM) tijekom 6, 9 i 11 dana (d). Produkti RT-PCR analize odvojeni su elektroforezom na 1 %-tnom agaroznom gelu (prilagođeno prema Silva–Ortega 2007)

Izvjerna je povezanost između regulacije transkripcije i akumulacije Pro s povišenjem koncentracije NaCl-a, pokazana devetog dana stresnih uvjeta kao i jedanaestog dana pri koncentraciji NaCl-a od 250 mM. Uzroci povećanog sadržaja Pro mogu biti *de novo* sinteza ili smanjenje stupnja sinteze proteina i/ili degradacije proteina. Možemo pretpostaviti kako je nakupljanje Pro najvjerojatnije posljedica *de novo* sinteze zbog činjenice da solni stres inducira gen *Osp5cs*, kako je pokazano primjerima, koji kodira za enzim P5CS. Prva dva koraka biosinteze Pro iz Glu kod biljaka katalizira upravo enzim P5CS.

### 3.4 Utjecaj apscizinske kiseline (ABA) na ekspresiju gena *Osp5cs*

Tijekom abiotičkog stresa ABA je jedna od glavnih komponenata signalnog puta. Dugo je poznata kao posrednik u odgovorima biljke na različite stresne uvjete okoliša, posebno na sušu i salinitet. Utječe na uzorke ekspresije više od 1000 gena kod *A. thaliana* (L.) Heynh. (Seki 2002), a kod *A. thaliana* (L.) Heynh. i riže (*Oryza sativa* L.) ABA regulira ekspresiju gena *p5cs* (Igarashi 1997, Yoshida 1995).

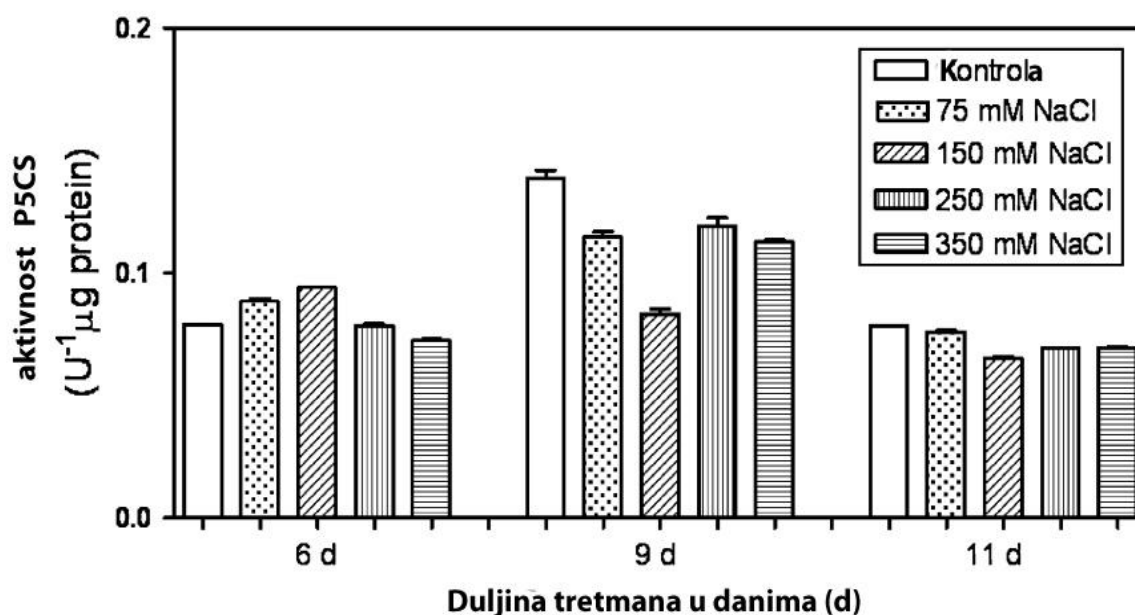
Kako bi ispitali utjecaj ABA na gen *Osp5cs*, Silva-Ortega i suradnici (2007) proučili su djelovanje ovog hormona (Slika 6.) na 9 tjedana starim biljkama *O. streptacantha* Lem., primjenjujući 0 (kontrola), 0,1 i 100  $\mu\text{M}$  ABA u Hoaglandovoj hranjivoj otopini u uvjetima svjetla tijekom 1,5 sati nakon čega je izolirana ukupna RNA iz mladih kladodija te su korišteni uzorci RNA (1  $\mu\text{g}$ ) za RT-PCR analizu. Produkti RT-PCR analize odvojeni su na 1%-tnom agaroznom gelu pomoću elektroforeze (Slika 6.). ABA regulira transkripciju gena *Osp5cs* prilikom tretmana s 0,1 i 100  $\mu\text{M}$  ABA, s time da niža koncentracija ABA (0,1  $\mu\text{M}$ ) potiče najveće nakupljanje *Osp5cs* transkripata u usporedbi s kontrolom. Kod *O. streptacantha* Lem. podaci ukazuju na činjenicu da ABA djeluje kao induktor gena *Osp5cs*.



**Slika 6.** Utjecaj ABA na ekspresiju gena *Osp5cs* kod *O. streptacantha* Lem. Iz 9 tjedana starih kladodija izolirana je ukupna RNA s time da su biljke prethodno tretirane s 0 (kontrola), 0,1 i 100  $\mu\text{M}$  ABA tijekom 1,5 h. RT-PCR produkti su odvojeni elektroforezom na agaroznom gelu. Aktin je korišten kao kontrola. Histogram prikazuje relativno prisustvo *Osp5cs* cDNA nakon normalizacije aktinskim signalom (prilagođeno prema Silva-Ortega 2007)

### 3.5 Utjecaj solnog stresa na aktivnost $\Delta^1$ -pirolin-5-karboksilat-sintetaze

Aktivnost P5CS ostaje ista ili se općenito smanjuje kod roda *Opuntia* Mill. kao posljedica solnog stresa, osim šestog dana tretmana pri nižim koncentracijama NaCl-a (75 i 150 mM) gdje je primjećen blagi porast aktivnosti, dok je općenito značajnije smanjenje aktivnosti P5CS devetog dana stresa u usporedbi s kontrolom (Slika 7.) (Silva-Ortega 2007). Usprkos činjenici da su devetog i jedanaestog dana solnog stresa mlade biljke *O. streptacantha* Lem. pokazale manju aktivnost P5CS, nakupile su većinu sadržaja Pro (Silva-Ortega 2007).



Slika 7. Prikazana je aktivnost P5CS ( $\Delta^1$ -pirolin-5-karboksilat-sintetaze) u kladodijima *O. streptacantha* Lem. nakon tretmana s 0 (kontrola), 75, 150, 250 i 350 mM NaCl-a tijekom 6, 9 i 11 dana (prilagođeno prema Silva-Ortega 2007)

Moguće je da solni stres samo inducira sintezu ili stabilizaciju *Osp5cs* transkripta bez povećanja aktivnosti enzima P5CS koji katalizira sintezu Pro iz Glu dvjema sukcesivnim redukcijama.

### 3.6 Utjecaj solnog stresa na sadržaj klorofila kladodija

Promjene u sadržaju klorofila lista mogu se koristiti kao indikator maksimalnog fotosintetskog kapaciteta, stadija razvoja lista, produkcije i stresa (Gitelson 1996), a sam sadržaj klorofila osnova je razumijevanja biljnog odgovora na uvjete u kojima se ona nalazi. Kod biljaka osjetljivih na sol poput rajčice, krumpira, graha i graška, pokazano je smanjenje

sadržaja klorofila (Sudhir 2004), dok je kod *Amaranthus tricolor* L. tretiranim 7 dana s 300 mM NaCl dokazano povećanje sadržaja klorofila tijekom solnog stresa (Wang 2000).

Kako bi saznali postoje li oštećenja u fotosintetskom metabolizmu *Opuntia* Mill. kao posljedica solnog stresa, Silva-Ortega i suradnici mjerili su ukupni sadržaj klorofila kladodija u istih biljaka podvrgnutih stresu kao i za analizu Pro. Izmjereni sadržaj klorofila šestog dana solnog stresa pri 75 i 150 mM NaCl-a pokazuje 4-erostruko, odnosno 7-erostruko povećanje u usporedbi s kontrolom, dok je povećanje pri 250 i 350 mM NaCl-a manje od prethodnog. Devetog i jedanaestog dana sadržaj klorofila se proporcionalno povećava s povišenjem koncentracije NaCl-a.

Pokazano je da se sadržaj klorofila *O. streptacantha* Lem. povećava u uvjetima solnog stresa, a samo povećanje moglo bi biti posljedica razvitka kloroplasta ili povećanja broja tilakoida. S obzirom da Pro djeluje kao stabilizator proteina, Silva-Ortega i suradnici pretpostavljaju da bi Pro mogao štititi enzime uključene u biosintezu klorofila, od stresnih uvjeta te bi visok sadržaj Pro u *O. streptacantha* Lem. tijekom solnog stresa mogao biti uključen u održavanje razine klorofila i turgora.

## 4. Zaključak

Eksperimentima je potvrđen utjecaj solnog stresa na nakupljanje Pro i transkripcijsku regulaciju gena *Osp5cs*. Značajno nakupljanje Pro u uvjetima solnog stresa kod biljaka *O. streptacantha* Lem. upućuje na činjenicu da bi uloga Pro mogla biti povezana s unutarstaničnim osmotskim prilagodbama. Transkripcijska regulacija gena *Osp5cs* (eng. *up-regulation*) tijekom solnog stresa u korelaciji je s nakupljanjem Pro, usprkos razlikama u promjeni enzimatske aktivnosti P5CS ( $\gamma$ -glutamil kinaza i glutamat-5-semialdehid dehidrogenaza). Solni stres bi mogao utjecati samo na indukciju sinteze i/ili stabilizacije transkripta *Osp5cs* bez daljnjeg povećanja aktivnosti enzima P5CS (Silva-Ortega 2007). Postoji mogućnost da ABA tijekom solnog stresa djeluje kao posrednik u regulaciji gena *Osp5cs* s obzirom na njenu dokazanu ulogu u indukciji ekspresije tog gena. Kod roda *Opuntia* Mill., glavnu ulogu u održanju turgora i zaštiti fotosintetske aktivnosti mogao bi imati upravo Pro.

## 5. Popis literature

- A.J. Delauney, D.P.S. Verma, Proline biosynthesis and osmoregulation in plants, *Plant J.* 4 (1993) 215e223.
- V.A. Franco-Salazar, J.A. Ve'liz, Respuestas de la tuna [*Opuntia ficus-indica* (L.) MILL.] al NaCl, *Interciencia* 32 (2007) 125e130.
- A. Flores-Herna'ndez, B. Murillo-Amador, J.L. Garc'a-Herna'ndez, H.C. Fraga-Palomino, Concentraci'ón de prolina en brotes de cultivares de nopal (*Opuntia megacantha*) sometidos a estre's por calor, *Phyton*. 65 (2001) 15e24.
- A.A. Gitelson, M.N. Merzlyak, Signature analysis of leaf reflectance spectra: algorithm development for remote sensing of chlorophyll, *J. Plant Physiol.* 148 (1996) 494e500.
- D.R. Hoagland, D.I. Arnon, The Water-culture Method for Growing Plants without Soil Univ. of California Agric. Exp. Stn. Circ. 347, Univ. of California, Berkeley, CA, 1950.
- C.A.A. Hu, A.J. Delauney, D.P.S. Verma, A bifunctional enzyme (D1-pyrroline-5-carboxylate synthetase) catalyzes the first two steps in proline biosynthesis in plants, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89 (1992) 9354e9358.
- Y. Igarashi, Y. Yoshiba, Y. Sanada, K. Yamaguchi-Shinozaki, K. Wada, K. Shinozaki, Characterization of the gene for D1-pyrroline-5-carboxyl-ate synthetase and correlation between the expression of the gene and salt tolerance in *Oryza sativa*, *Plant Mol. Biol.* 33 (1997) 857e865.
- J.F. Jime'nez-Bremont, A. Becerra-Flora, E. Herna'ndez-Lucero, M. Rodri'guez-Kessler, J.A. Acosta Gallegos, J.G. Ram'irez-Pimentel, Proline accumulation in two bean cultivars under salt stress and the effect of polyamines and ornithine, *Biol. Plant.* 50 (2006) 763e766.
- P.B. Kavi Kishor, S. Sangam, R.N. Amrutha, P. Sri Laxmi, K.R. Naidu, K.R.S.S. Rao, S. Rao, K.J. Reddy, P. Theriappan, N. Sreenivasulu, Regulation of proline biosynthesis, degradation, uptake and transport in higher plants: its implications in plant growth and abiotic stress tolerance, *Curr. Sci.* 88 (2005) 424e438.
- B. Murillo-Amador, A. Corte's-Avila, E. Troyo-Die 'guez, A. Nieto-Garibay, H.G. Jones, Effects of NaCl salinity on growth and production of young cladodes of *Opuntia ficus-indica*, *J. Agron. Crop Sci.* 187 (2001) 269e279.
- A. Nerd, A. Karadi, Y. Mizrachi, Salt tolerance of prickly pear cactus (*Opuntia ficus-indica*), *Plant Soil* 13 (1991) 201e207.
- P.S. Nobel, Remarkable Agaves and Cacti, Oxford University Press, New York, 1994.

- D. Rhodes, A.D. Hanson, Quaternary ammonium and tertiary sulfonium compounds in higher plants, *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 44 (1993) 357e384.
- M. Seki, J. Ishida, M. Narusaka, M. Fujita, T. Nanjo, T. Umezawa, A. Kamiya, M. Nakajima, A. Enju, T. Sakurai, M. Satou, K. Akiyama, K. Yamaguchi-Shinozaki, P. Caminci, J. Kawai, Y. Hayashizaki, K. Shinozaki, Monitoring the expression pattern of around 7,000 *Arabidopsis* genes under ABA treatments using a full-length cDNA microarray, *Funct. Integr. Genomics* 2 (2002) 282e291.
- C. O. Silva-Ortega, A. E. Ochoa-Alfaro, J. A. Reyes-Aguero, G. A. Aguado-Santacruz, J. F. Jimenez-Bremont, Salt stress increases the expression of *p5cs* gene and induces proline accumulation in cactus pear, *Plant Physiology and Biochemistry* 46 (2008) 82e92
- P. Sudhir, S.D.S. Murthy, Effects of salt stress on basic processes of photosynthesis, *Photosynthetica* 42 (2004) 481e486. 91 C.O. Silva-Ortega et al. / *Plant Physiology and Biochemistry* 46 (2008) 82e92
- Y. Wang, N. Nii, Changes in chlorophyll, ribulose biphosphate carboxylase-oxygenase, glycine betaine content, photosynthesis and transpiration in *Amaranthus tricolor* leaves during salt stress, *J. Hortic. Sci. Biotechnol.* 75 (2000) 623e627.
- Y. Yoshida, T. Kiyosue, T. Katagiri, H. Ueda, T. Mizoguchi, K. Yamaguchi-Shinozaki, K. Wada, Y. Harada, K. Shinozaki, Correlation between the induction of a gene for D1-pyrroline-5-carboxylate synthetase and the accumulation of proline in *Arabidopsis thaliana* under osmotic stress, *Plant J.* 7 (1995) 751e760.
- <http://www.xenbase.org/common/showImage.do?imageId=40966>

## 6. Sažetak

Salinitet je jedan od glavnih čimbenika koji ograničavaju biljni razvoj i produktivnost, posebno važnih usjeva. U pustinjским i polupustinjskim područjima, zbog nedostatka pitke vode, povećana je upotreba slane vode za navodnjavanje u poljoprivredi. U uvjetima solnog stresa i nedostatka vode, Pro je jedan od osmolita koji se najviše nakuplja u biljkama, stoga se mjerio sadržaj Pro u uvjetima solnog stresa. Ispitivana je ekspresija  $\Delta^1$ -pirolin-5-karboksilat sintetaze (gen *Osp5cs*) te aktivnost P5CS ( $\gamma$ -glutamil kinaza i glutamat-5-semialdehid dehidrogenaza) kao glavnog enzima biosintetskog puta Pro kod vrste *O. streptacantha* Lem. Mlade biljke *O. streptacantha* Lem. su nakon tretmana solnim stresom (6, 9 i 11 dana), pokazale smanjenje debljine kladodija i duljine korijena te značajno i postepeno nakupljanje Pro u ovisnosti o koncentraciji i vremenu. Solni je stres, općenito, doveo do smanjenja aktivnosti P5CS ( $\gamma$ -glutamil kinaza), osim pri koncentraciji NaCl-a od 75 i 150 mM tijekom šestog dana. Gen *Osp5cs* vrste *O. streptacantha* Lem. je induciran solnim stresom devetog i jedanaestog dana tretmana, što je potvrđeno RT-PCR analizom. U mladim je kladodijima ABA, istotako, inducirala ekspresiju gena *Osp5cs*. Pod utjecajem solnog stresa postoji jasna povezanost između nakupljanja Pro i transkripcijske regulacije gena *Osp5cs*, što se ne poklapa s promjenama u aktivnosti enzima P5CS. Pro bi mogao djelovati kao osmolit u uvjetima solnog stresa te imati uloge u osmotskoj regulaciji i zaštiti fotosintetske aktivnosti *O. streptacantha* Lem.



## 7. Summary

Salinity is one of the major factors limiting plant development and productivity, mainly of important crops. In arid and semiarid regions due to fresh water shortage, agriculture has increased usage of saline water. In salt stress and water deficit conditions, Pro is one of the most accumulated osmolytes in plants thus Pro content has been measured in such conditions. Expression level of  $\Delta^1$ -pyrroline-5-carboxylate synthetase (*Osp5cs* gene) and P5CS ( $\gamma$ -glutamyl kinase and glutamate-5-semialdehyde dehydrogenase) as a major enzyme of Pro biosynthetic pathway has been measured in *O. streptacantha* Lem. Salt stress treatment (6, 9 and 11 days) of *O. streptacantha* Lem. young plants resulted in a decrease of cladode thickness and root length, and in a significant and gradual accumulation of Pro depending of time and concentration. In general, salt stress has lead to P5CS ( $\gamma$ -glutamyl kinase) reduced activity, except at 75 and 150 mM NaCl at the sixth day. *Osp5cs* gene of *O. streptacantha* Lem. was induced by salt stress at ninth and eleventh day of treatment which has been confirmed by RT-PCR analysis. ABA also induced *Osp5cs* gene expression in young cladodes. Pro accumulation and *Osp5cs* gene transcription regulation revealed evident correlation between them under salt stress conditions without conferring with the changes in P5CS enzymatic activity. Pro might function as an osmolyte in salt stress conditions and might have a major role in osmotic regulation and photosynthetic activity protection of *O. streptacantha* Lem.